



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIODIVERSIDADE, ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO

GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE *Cattleya nobilior*
RCHB. F. (ORCHIDACEAE), E SUA ACLIMATIZAÇÃO POR MEIO DO USO
DE PALHADA DE SOJA NO SUBSTRATO

SILENE LÍVIA AIRES DE OLIVEIRA

PORTO NACIONAL – TOCANTINS

2019

SILENE LÍVIA AIRES DE OLIVEIRA

**GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE *Cattleya nobilior* RCHB.
F. (ORCHIDACEAE), E SUA ACLIMATIZAÇÃO POR MEIO DO USO DE
PALHADA DE SOJA NO SUBSTRATO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ecologia e Conservação da Universidade Federal do Tocantins, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade, Ecologia e Conservação.

Orientadora: Dr^a. Kellen Lagares Ferreira Silva Co-orientador: Dr. Wagner de Melo Ferreira

PORTO NACIONAL – TOCANTINS

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

- O48g Oliveira, Silene Livia Aires de.
 Germinação e desenvolvimento in vitro de *Cattleya nobilior* RCHB. F.
 (Orchidaceae), e sua aclimatização por meio do uso de palhada de soja no substrato. /
 Silene Livia Aires de Oliveira. – Porto Nacional, TO, 2019.
 42 f.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins
 – Câmpus Universitário de Porto Nacional - Curso de Pós-Graduação
 (Mestrado) em Biodiversidade, Ecologia e Conservação, 2019.
 Orientadora : Kellen Lagares Ferreira Silva
 Coorientador: Wagner De Melo Ferreira
1. Anatomia foliar. 2. Cultivo in vitro. 3. Orquídea.

CDD 577

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Silene Livia Aires de Oliveira

GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO IN VITRO DE Cattleya nobilior RCHB. F. (ORCHIDACEAE), E SUA ACLIMATIZAÇÃO POR MEIO DO USO DE PALHADA DE SOJA NO SUBSTRATO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ecologia e Conservação. Foi avaliada para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade, Ecologia e Conservação e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Data de aprovação: 25/02/2019

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Kellen Lagares Ferreira Silva (Orientadora), UFT

Prof^o. Dr^o. Rodney Haulien Oliveira Viana, UFT

Prof^o. Dr^o. Rafael Jose de Oliveira, UFT

Porto Nacional, 2019

*À minha Família
pelo que deixei de dar-lhes
e pelo que recebi de amor, ajuda e compreensão
nesses dois anos de mestrado.
Dedico.*

*“Questions of science, science and progress
do not speak as loud as my heart.”*

(The Scientist – Cold Play)

AGRADECIMENTOS

Gratidão eterna a Deus por me amar e me escolher para viver, capacitando-me em todos os momentos e ao conceder-me a vida nesta família maravilhosa que tenho.

Aos meus filhos Rafaela Aires Bandeira, Daniela Aires e Vicente Júnior por serem as partes que compõem o meu ser, por serem meus grandes incentivadores, alicerces, razões do contínuo querer fazer o meu melhor ... por serem o meu tudo, o meu mundo e, pela valiosa oportunidade de vivenciar o verdadeiro amor incondicional. Aos meus genros Haroldo Bandeira Filho e Stefan Brito; ao meu netinho Vítor que alegria ainda mais nossa vida; aos meus pais Maria Perpétua Aires de Oliveira e Divino José de Oliveira; aos meus irmãos Sérgio, Leekenia e Letícia; sobrinhos e cunhados; ao meu filho de coração Eduardo e família pela oportunidade de convivência. Enfim ... obrigada família pelo amor, carinho, compreensão, ajuda, credibilidade e apoio em todas as minhas decisões, erros e acertos. Amo demasiadamente vocês!!

À minha prima Lila de Fátima Aires Azevedo por colaborar ativamente a tornar esse sonho possível.

À Maíra Jéssica amiga irmã de alma e coração que o mestrado me trouxe. Meu muito obrigado pela amizade sincera, carinho, cumplicidade, companheirismo, divã, paciência, incentivos, ajuda incondicional na execução do projeto. Também pelos açaís, cafés, sorrisos, saídas a campo, enfim ... por estar incansavelmente presente na minha vida nesses dois anos.

À Andressa Hulmann primeira valiosa amiga que o mestrado me presenteou. Formamos uma dupla “imbatível” em todas as disciplinas ao buscarmos sempre extrair o melhor de nós. Obrigada pela amizade, carinho, cumplicidade, pelos ensinamentos compartilhados.

Aos meus colegas de Mestrado: Carla, Mellis, Sirlei, Kerliane, Eveny, Welloyane, Paulo, Guilherme, Mauro, Nilton, Raylon, Marcos, Marco Aurélio, Newton pela oportunidade de convivência, amizade e trocas de experiências.

À minha orientadora Professora Dr^a Kellen Lagares pelo aceite na orientação, pela confiança em mim, por compartilhar seus valiosos conhecimentos de forma admirável e paciente.

Ao meu orientador Professor Dr. Wagner de Melo pelo aceite na orientação, pela credibilidade, por sempre acreditar no meu potencial, pela presença constante e ativa, pelos valiosos ensinamentos de forma admirável e paciente.

Ao Professor Dr Rafael José de Oliveira um exímio mestre na arte de ensinar, sempre

disposto a compartilhar conhecimentos enriquecedores. Minha eterna admiração e gratidão pelas constantes orientações, ajudas, incentivos e por sempre acreditar no meu potencial, me fazendo entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente. Você sempre é meu maior referencial profissional na arte de ensinar.

Ao Coordenador do PPGBEC admirável Professor Dr Fernando Mayer Pelicice por acreditar no curso, na formação do “Ser Pensante”, por sempre impulsionar incansavelmente os mestrandos a buscar conhecimentos. Tarefa bastante árdua que faz com muita excelência.

Aos Professores Doutores do PPGBEC: Wagner Melo, Kellen Lagares, Solange Lolis, Fernando Pelicice, Rodney Viana, Tiago Krolow, Paulo Lucinda, Ronaldo Coimbra, Carine Chamom, Thiago Nilton, Renato Pinheiro, José Fernando, Adriana Malvásio, Carlos Roberto por compartilharem valiosas aprendizagens e pela oportunidade de convivência acadêmica.

À Ana Paula Chaves de Andrade secretária do PPGBEC pela constante atenção, apoio e paciência.

A todos do laboratório de Cultivo de Plantas *in vitro* (Neamb-UFT) Francisca (Fran) – por regar minhas orquídeas quando eu não podia estar; Joice e Bárbara – pelas contribuições nas produções de meios; Loury Lay e Lorryne – pela difícil contagem das minúsculas sementes da minha orquídea e, em especial aos mestres Laís Ramos (amiga pra vida toda) e Roney, sempre dispostos a me ajudar em todos os momentos nesses dois anos de experimentos. Vocês foram essenciais.

Aos técnicos de laboratório Alexandre Pereira Trancoso Borges (técnico do laboratório de microscopia), Assuério Aires de Souza (estereomicroscopia) e Izabel Pereira Braga (genética e bioquímica) pela amizade, constante apoio e disponibilidade.

Às colegas do Laboratório de Anatomia da UFT Porto/Palmas pelas valiosas contribuições.

À toda equipe da UFT Campus de Porto Nacional e Palmas pelo apoio e disponibilidade.

Ao Estado do Tocantins/SEDUC/DRE de Porto Nacional pela concessão de licença de estudo o qual foi de extrema importância para o desenvolvimento deste trabalho. Oportunizar aquisição de novas aprendizagens aos servidores da Educação é uma atitude proativa de uma gestão que busca alcançar a excelência, da difícil tarefa no processo ensino/aprendizagem.

A todos que de uma forma ou de outra me ajudaram a chegar até aqui.

... minha eterna gratidão!

RESUMO

Cattleya nobilior (Orchidaceae) se destaca por possuir atributos peculiares que ocasionam sua intensa exploração induzindo à vulnerabilidade da espécie. Essa ameaça pode ser atenuada pelo uso das técnicas *in vitro*. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de diferentes meios de cultura na germinação e no desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya nobilior*, e descrever possíveis respostas anatômicas de indivíduos durante a fase de aclimatização utilizando palhada de soja (*Glycine max*) como componente do substrato. Foram avaliados os efeitos dos seguintes meios de cultura na germinação e desenvolvimento dos protocormos: Murashige e Skoog (100 e 50%), Knudson C. e Vacin e Went. A aclimatização das plantas foi realizada em condições de laboratório e de viveiro utilizando diferentes proporções de Bioplant e palhada de soja como substrato. Estudos anatômicos foram realizados em folhas de plantas aclimatizadas. KC foi o meio mais adequado para germinação das sementes e desenvolvimento pós-germinativo de *C. nobilior*. Em relação à fase de aclimatização, recomenda-se o uso de um substrato composto por 60% de palhada de soja e 40% de Bioplant. Antes da transferência para o viveiro os indivíduos devem ser transplantados para vasos contendo uma mistura de 40% de palhada de soja e 60% Bioplant. Esses resultados indicam que a palhada de soja pode ser utilizada como substrato alternativo no cultivo de *C. nobilior*. As características anatômicas foliares observadas são típicas do gênero *Cattleya* e revelaram a presença de estruturas relacionadas a plantas epifíticas adaptadas a ambientes com escassez hídrica.

Palavras-chave: Anatomia foliar. Cultivo *in vitro*. Orquídea.

ABSTRACT

Cattleya nobilior (Orchidaceae) stands out for having peculiar attributes that cause its intense exploitation and can lead to the vulnerability of the species. This threaten can be curbed by the use of *in vitro* techniques. Thus, the objective of the present study was to evaluate the effects of different culture media on the germination and development of *Cattleya nobilior* under *in vitro* conditions and to describe leaf anatomical responses of plants during the acclimatization stage using soybean residues as part of the substrate. The effects of the following culture media on the *in vitro* germination and protocorm development were assessed: Murashige e Skoog (full- and half-strength), Knudson C, and Vacin e Went. Acclimatization was carried out under laboratory and under shade-house conditions using different proportions of Bioplant and soybean residues as the substrate. Anatomical studies were conducted on the leaves of acclimatized plants. KC was the most suitable culture medium for both germination and initial development of *C. nobilior*. Regarding the acclimatization phase, it is recommended that a substrate composed of 60% soybean residues and 40% Bioplant be initially used. Upon transfer to shade-house conditions plants should be grown in pots containing a mix of 40% soybean residue and 60% Bioplant. These results indicate that soybean residues can be used as an alternative component of the substrate for the acclimatization of *C. nobilior*. The leaf anatomical characteristics observed were typical of the genus *Cattleya* and revealed the presence of structures related to epiphytic plants adapted to water-poor environments.

Key words: Foliar anatomy. *In vitro* culture. Orchid

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-2 *Cattleya nobilior* em ambiente natural na Universidade Federal do Tocantins, Campus de Porto Nacional. 1 - Flor; 2 – fruto.....21

Figura 3-6 Estágios de desenvolvimento de *C. nobilior* 90 dias após os primeiros indícios de germinação *in vitro*. 3 – protocormo clorofilado; 4 – protocormo com uma folha; 5 – protocormo com duas ou mais folhas; 6 – plântula com folhas e uma ou mais raízes. Barras = 1 mm.....29

Figura 7-9 *Cattleya nobilior* na segunda fase de aclimatização no viveiro de plantas do Campus de Porto Nacional da Universidade Federal Tocantins. 7. Visão geral dos vasos; 8. Detalhe de alguns vasos; 9. Detalhe de uma planta.....32

Figura 10 Média de altura, número de folhas e raízes, comprimento da maior raiz de plantas de *Cattleya nobilior* ao final da primeira e segunda fase de aclimatização utilizando substratos compostos por diferentes proporções de palhada de soja e Bioplant. Barras indicam intervalo de confiança de 95%.....34

Figura 11-14 Aspectos anatômicos de secções transversais da região basal de folhas de *Cattleya nobilior* (Orchidaceae) após 150 dias de aclimatização. 11 – corte transversal de folha do tratamento 6 (100% Bioplant); 12-13 - corte transversal de folha do tratamento 3 (60% palhada); 14 - corte transversal de folha do tratamento 5 (20% palhada). Barra = 100µm. Legenda: St = estômato; Hp = hipoderme; Fv = feixe vascular; Mf = mesofilo; Ct = cutícula.....39

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Germinabilidade de sementes de *Cattleya nobilior* nos meios MS e ½MS (Murashige e Skoog), KC (Knudson) e VW (Vacin e Went). Valores seguidos por letras diferentes apresentam variação significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey no nível de probabilidade de 5%.....27
- Tabela 2** - Índice de crescimento de *C. nobilior* 90 dias após a germinação nos meios MS e ½MS (Murashige e Skoog), KC (Knudson) e VW (Vacin e Went). Os valores seguidos pela mesma letra não apresentam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey no nível de probabilidade de 5%.....29
- Tabela 3** - Percentual de sobrevivência de *C. nobilior* na primeira e na segunda fase de aclimatização após 60 e 90 dias de cultivo *ex vitro*, respectivamente, utilizando substratos compostos por diferentes proporções de palhada de soja e Bioplant.....30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APG	The Angiosperm Phylogeny Group
°C	Grau Celsius
FAA	Formaldeído, Ácido acético e Álcool etílico
KC	Knudson C
MS	Murashige e Skoog
NEAMB	Núcleo de Estudos Ambientais
P.A.	Para Análise
PPGBEC	Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ecologia e Conservação
PS	Palhada de Soja
SPDPC	Seção de Propagação e Desenvolvimento de Plantas do Cerrado
UFT	Universidade Federal do Tocantins
VW	Vacin e Went

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	Centímetro
L	Litro
Mg	Miligramma
ml	Mililitro
pH	Potencial hidrogeniônico
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μmol	Micromol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
2.1	Descrição da espécie.....	21
2.2	Influência dos meios de cultura na germinação e no desenvolvimento <i>in vitro</i>	22
2.3	Aclimatização	23
2.4	Análises anatômicas.....	24
2.5	Análises estatísticas.....	25
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
3.1	Germinabilidade das sementes e crescimento inicial <i>in vitro</i>	26
3.2	Aclimatização	30
3.3	Análises anatômicas.....	37
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
	REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae pertencente à ordem Asparagales (APG IV, 2016) é uma das maiores e mais diversificadas famílias inseridas no grupo das angiospermas compreendendo aproximadamente 35.000 espécies distribuídas em 800 gêneros (Faria et al. 2012). No domínio Cerrado, essa família é considerada a terceira em relação à representatividade (Barros et al. 2015). No Brasil foram descritas 2.449 espécies distribuídas em 237 gêneros (Krahl et al. 2014) o qual coloca o país como um dos maiores detentores de diversidades de orquídeas do continente americano e do mundo, sendo 1.620 espécies endêmicas (Barros et al. 2015).

O gênero *Cattleya* é composto por 45 espécies distribuídas nos trópicos desde o México até o Paraguai. Dentre elas a espécie *Cattleya nobilior* se destaca por possuir ampla capacidade de recombinação genética, estrutura, beleza e durabilidade de suas flores. Essas características contribuem para sua intensa exploração o que, de forma conjunta com a degradação de seus habitats, pode promover a vulnerabilidade da espécie (Bianchetti, 2007; Silva et al. 2009). Mesmo não sendo considerada ameaçada de extinção, a preocupação com o *status* de conservação dessa espécie faz-se necessária por não haver conhecimento adequado sobre sua propagação, colocando-a na lista das espécies com informações deficientes o que impossibilita enquadramento na condição de ameaçada, de forma precisa e segura (Brasil, 2008).

A conservação de espécies orquídeas pode ser subsidiada por técnicas de cultivo *in vitro* (Ponert et al. 2013; Wotavocá-Novotná et al. 2007) a qual tem sido bastante utilizada para fins científicos e conservacionistas, pois resulta em elevados percentuais de germinação quando comparada às condições naturais (Stancato et al. 2001; Araújo et al. 2006; Faria et al. 2012). As respostas germinativas e de desenvolvimento das orquídeas são peculiares a cada espécie e dependem das necessidades nutricionais específicas nas diferentes etapas do

desenvolvimento, fazendo com que elas se desenvolvam em meios de cultura que atendam melhor essas especificidades para promover o sucesso da cultura assimbiótica (Stewart et al. 2006; Paul et al. 2012).

Portanto, estudos específicos sobre meios de cultura e nutrição mineral para cada espécie são necessários para compreensão de processos bioquímicos e ontogenéticos. Os meios nutritivos mais utilizados na germinação e no desenvolvimento de protocormos do gênero *Cattleya* são Murashige e Skoog (1962) [MS], Knudson C (1946) [KC] e Vacin e Went (1949) [VW] (Suzuki et al. 2010; Jorge et al. 2015; Faria et al. 2012). De acordo com as respostas germinativas e respectivas necessidades nutricionais básicas de cada espécie no processo *in vitro*, Stewart (1989) divide as orquídeas em dois grandes grupos, sendo o primeiro grupo constituído pelas espécies em que as sementes germinam em meios de cultura nutritivamente mais simples como o KC e VW e o segundo grupo as espécies que necessitam de meios nutritivamente mais ricos, isto é, com maior teor de macronutrientes como o MS.

Antes de serem levadas para o ambiente natural plantas produzidas *in vitro* necessitam de um período gradual de aclimatização para que possam sobreviver às condições *ex vitro*. Elas estarão suscetíveis a variações abióticas como luminosidade, temperatura, umidade e nutrientes (Díaz et al. 2010; Dorneles et al. 2011), como também sujeitas à infecções por fungos e bactérias que podem se desenvolver durante o processo de transferência para o ambiente natural e que muitas vezes pode causar perda de indivíduos (Lone et al. 2008; Ortega-Loeza, et al. 2011; Lesar et al. 2012). Nessa fase de aclimatização a planta depende, dentre outros fatores, do tipo de substrato a ser utilizado no transplântio, que deve ter boa capacidade para retenção de água e, ao mesmo tempo, favorecer aeração das raízes, disponibilidade de nutrientes e pH adequado (Kämpf 2000; Souza 2003; Santos et al. 2010; Figueiredo et al. 2013).

Diferentes substratos alternativos têm sido usados para a aclimatização de orquídeas, dentre eles a fibra de coco, casca de pinus, casca de arroz carbonizada, fibra de piaçava, bagaço de cana, casca de barbatimão, casca de café, amendoeira, sabugo de milho e carvão

vegetal (Assis et al. 2008; Lone et al. 2008; Meurer et al. 2008; Yamamoto et al. 2009; Santos et al. 2010; Assis et al. 2011; Sasamori et al. 2014). Outra opção de substrato que poderia ser utilizado no processo de aclimatização dessas espécies é a palhada da soja (*Glycine max*) que apresenta potencial para tal finalidade.

Considerando a grande diversidade da família Orchidaceae bem como as necessidades peculiares de cada espécie, estudos anatômicos são importantes para a compreensão das adaptações das plantas a determinados ambientes e no entendimento de respostas fisiológicas durante etapas iniciais, consideradas as mais críticas no ciclo de vida de muitas espécies, e que determina a sobrevivência e estabelecimento destas no ambiente (Ferreira et al. 2015). A relevância de estudos relacionados à anatomia foliar em orquídeas é substantiada por proporcionar esclarecimentos sobre aspectos taxonômicos e ecológicos dessa família (Silva et al. 2014; Carneiro et al. 2017).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de diferentes meios de cultura na germinação e no desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya nobilior*, e descrever possíveis respostas morfoanatômicas de indivíduos dessa espécie orquidácea durante a fase de aclimatização utilizando palhada de soja (*Glycine max*) como componente do substrato.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Descrição da espécie

Cattleya nobilior Rchb. é uma orquídea epifítica ou rupícola encontrada no domínio Cerrado com distribuição nos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Rondônia, Tocantins, Maranhão e Distrito Federal. Sua ocorrência também foi registrada no Paraguai e na Bolívia (Barros et al. 2015; Bianchetti 2007). É uma planta rizomatosa, com pseudobulbos do tipo claviforme que podem variar de 5 até 10 cm (ou 10 até 30 cm) de comprimento contendo duas folhas com formato elíptica/oblunga. A inflorescência é formada em pseudobulbo diferenciado sem folha, contendo de uma a três flores de até 15 cm de diâmetro com cores de sépalas e pétalas que variam de rosa claro/rosa escuro/lilás. O labelo é trilobado, com istmo longo entre o lobo mediano e base dos lobos laterais. O labelo mediano apresenta mais no centro uma cor amarelo-limão em tonalidades diversas, mas ricamente estriados. A flor apresenta quatro polínias (Bertoncelli et al. 2018; Flora do Brasil 2020). Seu florescimento ocorre nos meses de agosto e setembro e devido à beleza de suas flores (Figura 1) a espécie está submetida à pressão de coletas por colecionadores e/ou comercializadores (Bianchetti 2007; Rodriguez et al. 2009; Barros et al. 2015).

Figura 1-2. *Cattleya nobilior* em ambiente natural na Universidade Federal do Tocantins, Campus de Porto Nacional. 1 - Flor; 2 - fruto.



Fonte: Silene Livia Aires de Oliveira, 2017

2.2 Influência dos meios de cultura na germinação e no desenvolvimento *in vitro*

Para o presente estudo foram utilizadas sementes de *C. nobilior* provenientes de cinco frutos coletados em 2015 de indivíduos crescendo no Orquidário do Núcleo de Estudos Ambientais, Campus de Porto Nacional da Universidade Federal do Tocantins. Antes da inoculação das sementes nos meios de cultura, elas foram embebidas em água autoclavada e deionizadas por 30 minutos e em seguida submetidas ao processo de assepsia que consistiu na imersão em solução de hipoclorito de sódio comercial na concentração de 15% [v/v], adicionada de duas gotas de detergente doméstico por 10 minutos. Posteriormente passaram por dupla lavagem de 15 minutos com 50 mL de água autoclavada e deionizada. Após a segunda lavagem 30 mL da água foi retirado e a suspensão aquosa de sementes (20 mL) foi utilizada para semeadura nos meios de cultura. O referido processo foi realizado em uma câmara de fluxo laminar de marca Veco modelo FUH 12.

Foram testados três meios de cultura: o meio de Knudson (1946) [KC], o de Vacin e Went (1949) [VW] e o de Murashige e Skoog (1962) [MS], nas concentrações de 100 e 50% de seus macronutrientes (MS e $\frac{1}{2}$ MS, respectivamente). Todos os meios foram suplementados com $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de tiamina, 100 mg.L^{-1} de mio-inositol e 2% de sacarose. O pH de cada meio de cultura foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da adição de 0,2% de Phytigel. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 20 minutos. Logo após a assepsia, as sementes foram inoculadas sobre os meios com o auxílio de uma micropipeta cuja dosagem foi de $250 \text{ }\mu\text{L}$ da suspensão aquosa citada acima, contendo aproximadamente 550 sementes. Para cada meio de cultura foram realizadas 10 repetições que consistiram em frascos de vidros com capacidade para 90 mL, contendo 40 mL de meio de cultura, fechados com tampas plásticas. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $35\text{-}40 \text{ }\mu\text{mol.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Trinta dias após visualização dos primeiros indícios de germinação, observado pela presença de material clorofilado no meio de cultura, realizou-se contagem das sementes germinadas, isto

é, sementes com embrião intumescido designado de fase de protocormo, sendo utilizadas quatro repetições por tratamento. Para essa avaliação o material contido em cada repetição foi colocado em lâminas quadriculadas para facilitar a contagem das sementes germinadas que foi realizada sob microscópio estereoscópico de marca MIKROS. Noventa dias após o início da germinação, os indivíduos contidos em quatro repetições, por tratamento, foram avaliados de acordo com a quantidade de órgãos sobre eles formados. Foram considerados quatro estágios de desenvolvimento: estágio 1 - protocormo (embriões intumescidos de coloração verde); estágio 2 – protocormo com uma folha; estágio 3 – protocormo com duas folhas e estágio 4 – plântula (folhas e raízes). Substanciado pela presente avaliação calculou-se o índice de crescimento baseado em Spoerl (1948), isto é, o percentual de indivíduos obtidos para cada estágio de desenvolvimento, por repetição, foi multiplicado pelos pesos 1, 2, 3 e 4 de acordo com os respectivos estágios. Utilizou-se a média da somatória de todos os estágios de desenvolvimento nelas presentes para calcular o índice de crescimento de cada repetição.

2.3 Aclimatização

O ensaio foi realizado no Laboratório de Cultivo de Plantas *in vitro* da Seção de Propagação e Desenvolvimento de Plantas do Cerrado (SPDPC), no Núcleo de Estudos Ambientais (NEAMB) da Universidade Federal do Tocantins (UFT), Campus de Porto Nacional, Tocantins, no período de abril a setembro de 2018.

O processo de aclimatização foi realizado em duas fases. Na primeira, foram utilizadas 180 plantas (com raízes e folhas já formadas) com aproximadamente 2 a 3 cm de altura, oriundas de cultivo *in vitro*. Estas foram lavadas em água corrente para a remoção do meio de cultura e transferidas para 36 recipientes plásticos (potes redondos com tampas transparentes e capacidade de 1000 mL), considerados comunitários contendo 5 indivíduos em cada. Foram realizadas seis repetições (potes) para cada tratamento. Os tratamentos foram compostos por palhada de soja e pelo substrato comercial Bioplant [Nova Ponte, MG],

nas proporções iniciadas com 100% e reduzindo de 20 em 20%, ou seja: tratamento 1 - 100:0% (1:0); tratamento 2 - 80:20% (4:1); tratamento 3 - 60:40% (3:2); tratamento 4 - 40:60% (2:3); tratamento 5 - 20:80% (1:4) e tratamento 6 (controle) - 0:100% (0:1). A palhada de soja, substrato alternativo testado, foi adquirida de uma lavoura na Fazenda Boa Sorte no município de Porto Nacional, Tocantins, durante o período de colheita da região (março/2017). Após totalmente seca, toda a parte aérea exceto fruto e semente, foi colhida manualmente e, em seguida triturada com o auxílio de um triturador. Os potes contendo as plantas permaneceram fechados e foram mantidos em sala de crescimento por 60 dias com uma irrigação de 250 mL de água a cada 15 dias, realizada com o auxílio de um borrifador (primeira fase). Após esse período, as plantas sobreviventes foram analisadas conforme as seguintes variáveis: altura da planta (da base até a ponta extrema da maior folha), comprimento da maior raiz, número de folhas e raízes, bem como o percentual de sobrevivência.

Na segunda fase as plantas (oriundas da primeira fase) foram transferidas para vasos plásticos individuais (7 cm altura x 6 cm de diâmetro basal) contendo os mesmos tratamentos descritos na primeira fase exceto aquele contendo apenas a palhada de soja. Estas permaneceram na sala de crescimento por 10 dias sendo irrigadas diariamente. Após esse período as plantas foram transferidas para viveiro com 75% de sombreamento e receberam irrigação diária até o ponto de capacidade de campo do substrato. Após 90 dias procedeu-se as mesmas mensurações e contagens realizadas na primeira fase.

2.4 Análises anatômicas

No final da segunda fase de aclimatização (90 dias) foram realizadas análises anatômicas de folhas no Laboratório de Anatomia no Núcleo de Estudos Ambientais (NEAMB) da Universidade Federal do Tocantins (UFT), Campus de Porto Nacional e no Laboratório de Anatomia Vegetal do Campus Palmas, Tocantins, no período de setembro de 2018 a janeiro de 2019.

Utilizou-se três plantas de cada tratamento. Foram feitos cortes transversais da

maior folha dividindo-a em três partes: base, meio e ápice. Para a microscopia de luz, as porções foliares foram imersas no fixador FAA 50% (formaldeído, ácido acético e álcool etílico 50%) em frascos individuais transparentes, com tampa de rosca, devidamente identificados para cada tratamento. Em seguida, os frascos foram colocados em dessecador acoplado à bomba de vácuo e estes permaneceram por 24 horas para retirada do ar dos tecidos e facilitar a penetração do fixador na peça anatômica. Transcorrido esse período, o FAA 50% foi substituído pelo álcool etílico 60% P.A. por uma hora e em seguida substituído pelo álcool etílico 70% P.A. Após 24 horas procedeu-se a desidratação e inclusão em parafina para posterior emblocamento em parafina + cera de abelha 8% (Johansen 1940).

Para realização dos cortes (12 μ m de espessura) foi utilizado micrótomo rotativo Leica RM2245 e aderidos às lâminas com adesivo de Haupt. Os cortes foram desidratados e corados em Azul de Alcian 1% e Safranina 1% (Luque et al. 1996). Em seguida as lâminas foram montadas utilizando Bálsamo do Canadá sob lamínula. Para a observação das estruturas utilizou-se microscópio óptico de marca Leica, modelo DM 500, e para a obtenção da documentação fotográfica, uma câmera digital ICC50 HD foi acoplada ao microscópio.

2.5 Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Para obter os pressupostos paramétricos, a homogeneidade foi testada pelo teste de Levene e normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, sendo transformada de acordo com Box-Cox quando necessário. Todas as análises foram feitas utilizando o software estatístico R (versão 3.4.2).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Germinabilidade das sementes e crescimento inicial *in vitro*

A fase de protocormo foi estabelecida como a efetiva germinação das sementes de orquídeas conforme descrita por Kraus et al. (2006). O processo se inicia com o intumescimento da semente que promove o rompimento do tegumento seminal e em seguida ocorre a liberação do embrião o qual se desenvolve numa estrutura tuberiforme clorofilada denominada de protocormo. Vinte dias após inoculação de sementes de *C. nobilior* nos diferentes meios de cultura observou-se indícios da germinação. Resultados diferentes foram observados para outras espécies do gênero *Cattleya* como relatado por Suzuki et al. (2010) para *C. bicolor* que formaram protocormos aos 15 dias após a inoculação e por Schneiders et al. (2012) para a espécie *C. forbesii* cujos protocormos foram observados 30 dias após a inoculação das sementes nos meios KC, MS e VW. Para as espécies *Alatiglossum fuscopetalum* (Ferreira et al. 2017) e *Catasetum macrocarpum* (Ferreira et al. 2018) os primeiros indícios de germinação foram observados 10 e 15 dias, respectivamente, após a inoculação simbiótica das sementes, períodos também distintos do observado no presente estudo. Nota-se que respostas germinativas de espécies orquídeas podem apresentar variações entre diferentes gêneros e até mesmo entre espécies de mesmo gênero, sendo, portanto, pertinente realização de estudos específicos, pois se pressupõe que o fator tempo atende às especificidades de cada espécie.

Os resultados da germinabilidade de *C. nobilior* estão apresentados na Tabela 1. Observou-se que não houve diferença significativa entre os meios MS, ½MS e KC apesar de o maior percentual de germinação ter sido verificado no meio KC. Tais resultados foram semelhantes aos encontrados por Suzuki et al. (2009) para a espécie *Hadrolaelia tenebrosa* onde o meio KC propiciou a maior taxa de germinação de sementes. Provavelmente, o meio KC favoreceu o melhor resultado para *C. nobilior* devido ao fato de ser um meio balanceado,

isto é, não ser tão rico em nutrientes quanto o meio MS e nem possuir baixas concentrações como o VW. Assim, o meio KC atende às necessidades nutricionais para a germinação de sementes dessa espécie, a qual se desenvolve naturalmente em ambientes epifíticos.

O menor percentual de germinação de sementes de *C. nobilior* foi observado no meio VW. Por outro lado, as espécies *Cyrtopodium punctatum* e *C. bicolor* apresentaram maior percentagem de germinação no meio VW (Dutra et al. 2009; Suzuki et al. 2010, respectivamente). Tais autores relacionam esses resultados à presença de amônia, sendo esta considerada mais eficiente na germinação de sementes de orquídeas do que o nitrato, visto que o meio VW apresenta a maior relação amônia/nitrato quando comparada aos meios KC e MS.

A germinabilidade de orquídeas em cultivos assimióticos apresenta variação percentual entre 50 e 95%, podendo chegar até 100%, conforme descrito por Ferreira et al. (2011). No entanto, algumas espécies podem apresentar percentual de germinação abaixo desses valores como o que foi observado em *C. nobilior*. Dutra et al. (2009) também verificaram baixos percentuais germinativos para a espécie *Cyrtopodium punctatum* (26,1% no meio VW) sendo esse valor superior àqueles encontrados nos meios ½ MS e KC.

Tabela 1. Germinabilidade de sementes de *Cattleya nobilior* nos meios MS e ½MS (Murashige e Skoog), KC (Knudson) e VW (Vacin e Went). Valores seguidos por letras diferentes apresentam variação significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey no nível de probabilidade de 5%.

Meio de Cultura	Germinabilidade (%)
MS	44,41 a
½MS	42,16 a
KC	46,71 a
VW	21,60 b

Fonte: Silene Livia Aires de Oliveira, 2018

Orquídeas cultivadas *in vitro* e que possuem naturalmente hábito epifítico, geralmente não apresentam exigências em concentrações de sais minerais no meio, pois estas já vivem em ambientes com nutrientes pouco disponíveis (Stancato 2008; Moraes et al. 2009; Cordeiro et al. 2011; Cunha et al. 2011). Isso também foi observado em *C. nobilior* o que indica que a mesma não necessita de grande demanda por nutrientes minerais para o desenvolvimento do embrião e a consequente germinação.

Suzuki et al (2010) afirmam que a escolha do meio de cultura é de suma importância para o sucesso da germinação de sementes de orquídeas e que os resultados de estudos sobre a influência de diferentes meios de cultura nesse processo possibilitam afirmar que respostas germinativas podem variar consideravelmente entre diferentes gêneros e entre as espécies de um mesmo gênero. Por essa razão, torna-se necessário estudar sobre composição nutricional para cada espécie, principalmente as ameaçadas de extinção cuja finalidade é proporcionar a multiplicação de plantas em maior quantidade e em menor tempo proporcionando a conservação das espécies *ex situ*.

Os resultados do desenvolvimento inicial avaliado por meio do índice de crescimento estão dispostos na Tabela 2. As figuras 3-6 mostram os quatros estágios utilizados para avaliar o desenvolvimento de *C. nobilior* após a germinação. Observou-se que o meio KC promoveu de maneira mais eficaz o desenvolvimento dos protocormos de *C. nobilior*, pois apresentou uma maior porcentagem de plantas nas fases mais avançadas de desenvolvimento (estágio 4), embora não tenha apresentado diferenças significativas quando comparado aos meios MS e ½ MS. A análise de desenvolvimento inicial realizada após 180 dias de semeadura *in vitro* por Suzuki et al. (2010) em *C. bicolor* também mostrou que o meio KC foi o mais promissor, pois apresentou protocormos em todas as fases de desenvolvimento sendo a maior proporção encontrada no estágio 4, como verificado no presente estudo. Esses dados indicam, portanto, que a espécie apresenta bom desenvolvimento em meio nutritivo mais similar ao ambiente oligotrófico que habitam naturalmente.

O meio KC também foi o mais eficaz para o desenvolvimento inicial de *Brassavola martiana* (Alves 2018) e *Cyrtopodium saintlegerianum* (Silva et al. 2017). Schneiders et al.

(2012) também recomendaram o meio KC para propagação de *Cattleya*, *Laelia*, *Laeliocattleya* e *Brassocattleya*. Assim, a germinação das sementes e o desenvolvimento pós-germinativo de *C. nobilior* nos meios de cultura testados podem indicar que essa espécie encontrou as condições nutricionais mais adequadas no meio KC.

Tabela 2. Índice de crescimento de *C. nobilior* 90 dias após a germinação nos meios MS e ½MS (Murashige e Skoog), KC (Knudson) e VW (Vacin e Went). Os valores seguidos pela mesma letra não apresentam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey no nível de probabilidade de 5%.

Meio de Cultura	Índice de Crescimento
KC	308,04 a
½MS	271,02 ab
MS	234,65 ab
VW	193,11 b

Fonte: Silene Livia Aires de Oliveira, 2018

Figura 3-6. Estágios de desenvolvimento de *C. nobilior* 90 dias após os primeiros indícios de germinação *in vitro*. 3 – protocormo clorofilado; 4 – protocormo com uma folha; 5 – protocormo com duas ou mais folhas; 6 – plântula com folhas e uma ou mais raízes. Barras = 1 mm.



Fonte: Silene Livia Aires de Oliveira, 2018

3.2 Aclimação

O percentual de sobrevivência das plantas de *C. nobilior* oriundas do cultivo *in vitro* e cultivadas em substrato composto por palhada da soja e Bioplant nas duas fases de aclimação está descrito na Tabela 3. Durante a aclimação (Figuras 7-9) a aparência física das plantas - vigor (Figura 9) indicou tolerância ao processo de transição (do ambiente *in vitro* para o *ex vitro*) utilizando as diferentes proporções de palhada de soja e Bioplant.

Tabela 3. Percentual de sobrevivência de *C. nobilior* na primeira e na segunda fase de aclimação após 60 e 90 dias de cultivo *ex vitro*, respectivamente, utilizando substratos compostos por diferentes proporções de palhada de soja e Bioplant.

Tratamentos	Fase 1 (%)	Fase 2 (%)
<u>Palhada (%):Bioplant (%)</u>		
100:0	0,00	NT*
80:20	73,3	40,0
60:40	80,0	60,0
40:60	70,0	66,7
20:80	76,7	43,5
0:100	83,3	36,0

* NT = não testado.

Fonte: Silene Lívia Aires de Oliveira, 2018

As plantas transferidas para o substrato contendo exclusivamente palhada não sobreviveram. Portanto, esse tratamento não é recomendável para a aclimação de *C. nobilior*. É possível inferir que tal fato tenha ocorrido devido a fatores como atividades metabólicas dos decompositores da palhada o qual promove aumento de temperatura e liberação de compostos (Silva et al. 2009), que podem prejudicar o desenvolvimento das raízes. Assis et al. (2011) ao testar em substrato à base de casca de café no cultivo de *Cattleya* também relatou que não é recomendável o uso deste como substrato único.

A presença da palhada nas proporções compreendidas entre 20 e 80% acrescida ao Bioplant mostrou resultados positivos para a espécie na primeira fase de aclimação, apresentando uma porcentagem de sobrevivência igual ou superior a 70%. Esse resultado é superior aos descritos por Dorneles et al. (2011) em estudos com uma espécie do mesmo gênero (*C. intermedia*) onde a porcentagem média de sobrevivência foi de 53% em substrato

de *Sphagnum* e 27% de sobrevivência das aclimatizadas em casca de pinus. Resultados semelhantes foram observados por Macedo et al. (2014) e Mengarda et al. (2017) com a espécie *Brassavola tuberculata* cuja porcentagem média de sobrevivência também foi de 70% em diferentes substratos (*Sphagnum*, carvão, fibra de coco, vermiculita, areia e pó-de-xaxim).

O tratamento que continha apenas o substrato Bioplant apresentou maior índice de sobrevivência apesar de a palhada de soja também ter apresentado taxa de sobrevivência satisfatória. Portanto, recomenda-se a utilização da palhada de soja nas proporções compreendidas entre 20 e 80% acrescida ao Bioplant como substrato na fase inicial de aclimatização, pois atendem as exigências nutricionais para o desenvolvimento de *C. nobilior* nessa primeira fase de transferência para condições *ex vitro* e ameniza custos com substrato comercial.

Na segunda fase da aclimatização observou-se uma redução no percentual de sobrevivência dos indivíduos em todos os tratamentos. Destes, a menor taxa observada foi no tratamento que continha exclusivamente o Bioplant provavelmente pelo fato de esse substrato perder rapidamente a umidade quando exposto ao ambiente de viveiro. Alves (2018) e Oliveira (2018) trabalhando na aclimatização das orquídeas *Brassavola martiana* e *Encyclia flava*, respectivamente, também observaram uma queda na sobrevivência das plantas ao trabalharem com o substrato Bioplant, quando exposto no viveiro.

Dorneles et al. (2011) relataram que durante o período de aclimatização de orquídeas obtidas *in vitro* a perda de indivíduos pode exceder a 50% em casa de vegetação durante os primeiros seis meses, resultado do período mais suscetível a perdas e também consequência de grandes alterações nas condições de cultivo (Kozai et al. 1992). É possível que durante a segunda fase de aclimatização, período em que as plantas foram cultivadas sob condições de viveiro (Figura 7-9), a diminuição da umidade atmosférica tenha contribuído para o aumento na taxa transpiratória e, assim, ocasionado uma diminuição do percentual de sobrevivência dos indivíduos. Situações semelhantes às observadas no presente estudo foram relatadas por

Alves (2018) ao estudar a aclimatização de *Brassavola martiana*.

Figura 7-9 *Cattleya nobilior* na segunda fase de aclimatização no viveiro de plantas do Campus de Porto Nacional da Universidade Federal Tocantins. 7. Visão geral dos vasos; 8. Detalhe de alguns vasos; 9. Detalhe de uma planta.



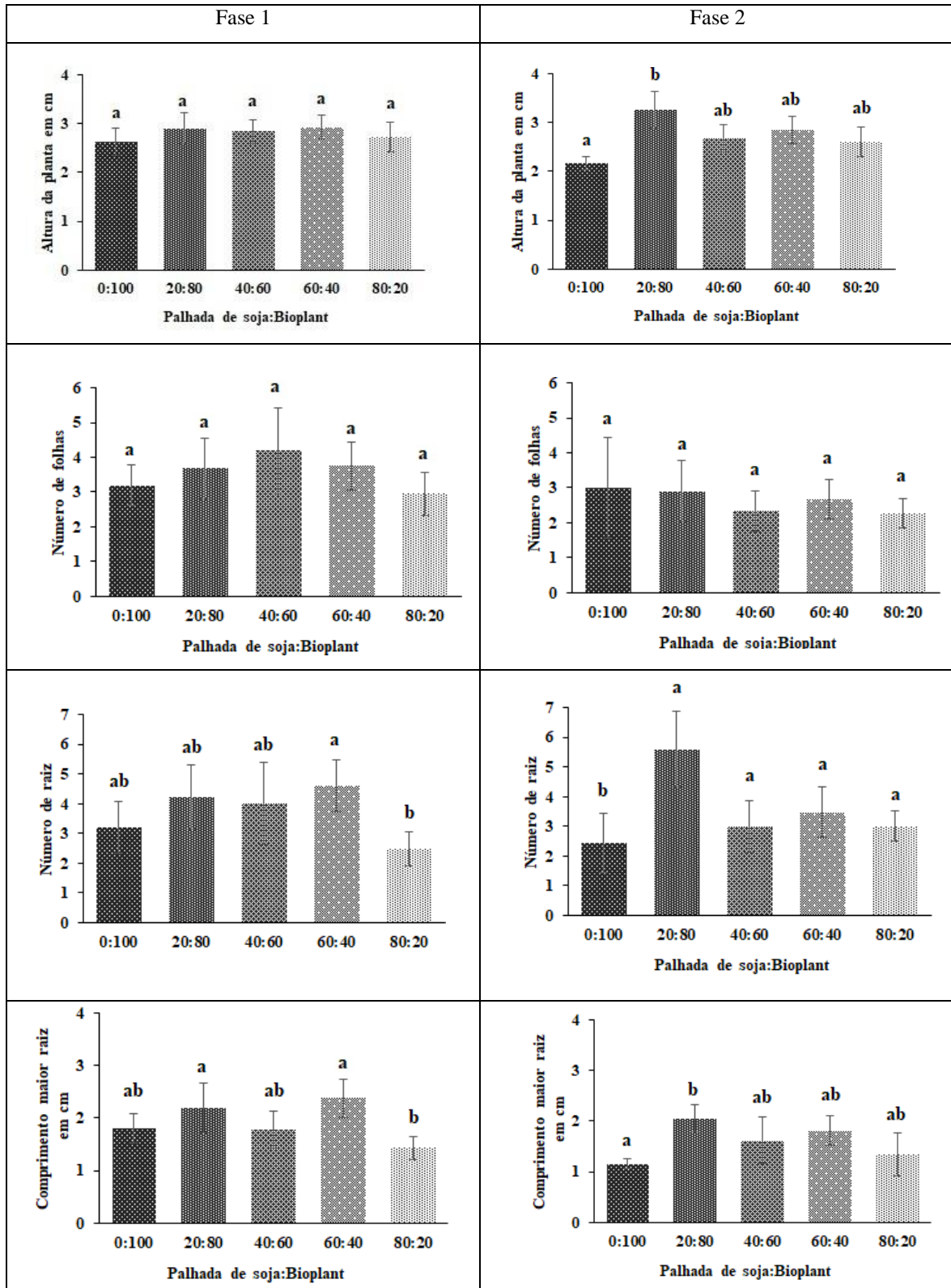
Fonte: Silene Livia Aires de Oliveira, 2018

A figura 10 contém os resultados das variáveis de crescimento avaliadas em ambas as fases. Não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos para maioria das variáveis analisadas em ambas as fases. No entanto, os tratamentos que continham um percentual de 20 a 60% de palhada acrescida ao Bioplant, na primeira fase, apresentaram maior comprimento da parte aérea (altura) de *C. nobilior*. Na segunda fase observou-se uma diferença entre os tratamentos que continham 0 e 20% de palhada, mostrando que as plantas que estavam sob a influência somente do substrato Bioplant apresentou menor altura quando comparadas aos demais tratamentos. Os percentuais de 20 e 60% de palhada adicionado ao Bioplant proporcionaram os melhores resultados. Lone et al. (2008) ao testarem novas alternativas de substratos para aclimatização de *C. intermedia*, indicaram os substratos xaxim e fibra de coco como substitutos ao xaxim e esfagno, visto que os resultados do comprimento da parte aérea foram melhores com a associação de xaxim e fibra de coco, quando comparados à casca de arroz carbonizada, embora não diferindo estatisticamente do esfagno, casca de pinus associada à fibra de coco e casca de pinus sozinha. Assim, se verifica que restos vegetais podem ser alternativas de substratos para aclimatização de orquídeas.

Em relação ao número de folhas, não foram observadas diferenças significativas

entre os tratamentos nem perdas desse órgão durante as duas fases da aclimatização, ou seja, todas as plantas permaneceram com folhas de coloração verde intensa, bem vistosas e aparentemente saudáveis, como pode ser observado na Figura 9 que corresponde à segunda fase. Alves (2018) também relatou que não houve perda de folhas de *B. martiana* durante a primeira fase de aclimatização, mas na segunda fase foram observadas perdas associadas à senescência natural do órgão. Dorneles et al. (2011) descreveram que a permanência das folhas está provavelmente associada às especificidades de cada espécie e/ou as condições físico-químicas do ambiente durante o processo de aclimatização. Como o ambiente atmosférico esteve bastante uniforme na primeira fase do presente estudo (sala de crescimento com temperatura e luminosidade constantes), as diferenças encontradas são possivelmente uma resposta ao substrato.

Figura 10. Média de altura, número de folhas e raízes, comprimento da maior raiz de plantas de *Cattleya nobilior* ao final da primeira e segunda fase de aclimatização utilizando substratos compostos por diferentes proporções de palhada de soja e Bioplant. Barras indicam intervalo de confiança de 95%.



Fonte: Silene Livia Aires de Oliveira, 2018

Em relação à variável número de raízes, observou-se que na primeira fase não houve diferença significativa entre os tratamentos compreendidos no intervalo entre 0 e 60% de palhada de soja. Porém, o tratamento que continha 80% de palhada de soja causou uma

diminuição dessa variável quando comparado aos demais tratamentos. Na segunda fase os resultados demonstraram não haver diferença significativa entre os tratamentos contendo de 20 a 80% de teor de palhada de soja. No entanto, o tratamento contendo o Bioplant como substrato único proporcionou uma diminuição significativa dessa variável.

Para a variável comprimento da maior raiz, não foram observadas diferenças significativas entre a maioria dos tratamentos na primeira fase da aclimatização embora em 80% de palhada de soja tenha se verificado um decréscimo dessa variável em relação aos tratamentos contendo 20 e 60% de palhada de soja. Na segunda fase observou-se uma diferença entre os tratamentos contendo 0 e 20% de palhada, demonstrando que o comprimento da raiz foi abaixo quando comparado aos demais tratamentos. Todavia, os melhores resultados foram observados no intervalo entre 20 e 60% de palhada de soja. Em conjunto, esses resultados demonstram que, de maneira geral, os diferentes tratamentos não influenciaram fortemente o crescimento em extensão das raízes.

Assis et al. (2011) também relataram que não houve diferença entre os tratamentos na avaliação de substratos à base de casca de café para o desenvolvimento de raízes de (*Cattleya forbesii* x *C. labiata*) x *C. labiata*. Dorneles et al. (2011) e Alves (2018) durante a aclimatização de *Cattleya intermedia* e *Brassavola martiana*, respectivamente, relataram que houve uma diminuição no comprimento da raiz de plantas crescendo no substrato Bioplant. Para Lone et al. (2008) as orquídeas epífitas, como as *Cattleya* e *Brassavola*, por exemplo, quando cultivadas em vasos apresentam melhor desenvolvimento em substratos de textura relativamente grossa e boa drenagem favorecendo livre acesso ao ar e à luz para o desenvolvimento das raízes. Ao contrário, substratos que não apresentam essas características tendem a limitar o desenvolvimento radicial. Colombo et al. (2005) também afirmaram que uma boa drenagem do substrato, característica também observada na palhada de soja, é fundamental para o desenvolvimento saudável das raízes de orquídeas epífitas.

Diante dos resultados obtidos observou-se que *C. nobilior* foi tolerante às diferentes proporções dos componentes do substrato utilizado. Portanto é possível inferir que a palhada de soja associada ao Bioplant é uma alternativa viável para a aclimatização de *C. nobilior*

por contribuir com a proteção do ambiente utilizando a palhada de soja ao invés de extrair espécies nativas como o pó-de-xaxim e o *Sphagnum*. As características físicas desse componente do substrato contribuíram para a aeração e retenção de umidade, além da disponibilização de nutrientes, fatores necessários ao desenvolvimento tanto da parte aérea quanto do sistema radicial de *C. nobilior* durante a aclimatização.

Visto que o referido processo é considerado como uma das etapas mais críticas e delicadas da micropropagação, *C. nobilior* apresentou um bom desempenho na primeira fase, quando comparada à segunda. O fato dos recipientes terem permanecido fechados durante a primeira fase propiciou um microclima com alta umidade relativa no interior, amenizando o impacto causado pela transferência da condição *in vitro* para a *ex vitro*, o que pode ter favorecido o estabelecimento das plantas e promovido seu desenvolvimento. Esse contato inicial das plantas com o substrato sólido na primeira fase de aclimatização é de suma importância, pois prepara as plantas para suportarem melhor a fase posterior (transferência para condições de viveiro), onde ocorrem diminuição na umidade atmosférica e aumento da intensidade luminosa, características mais semelhantes às encontradas no ambiente natural. O declínio nessa segunda etapa foi também observado em outros estudos realizados que mostraram diminuição no índice de sobrevivência (Dorneles et al. 2011; Alves 2018).

3.3. Análises anatômicas

Em corte transversal, a caracterização das folhas da espécie *C. nobilior* assemelha-se à descrita por Zanega-Godoy et al. (2003) e Diniz et al. (2011), pois apresentam epiderme uniestratificada e são hipoestomáticas. Essa característica foi encontrada na anatomia foliar de outras espécies do mesmo gênero como *C. walkeriana*, *C. araguaiensis* e *C. bicolor* (Zanega-Godoy et al. 2003), *C. violacea* (Saoncella et al. 2017), *C. jenmanii* e *C. lawrenceana* (Carneiro et al. 2017), assim como para gêneros diferentes como nas espécies *Oeceoclades maculata* (Riverón-Giró et al. 2017). Segundo Saoncella et al. (2017) a presença de estômatos somente na face abaxial é uma característica comum em espécies da família Orchidaceae e já foi observada para várias espécies da tribo Epidendroideae e

subtribo Laeliinae a qual está inserida a espécie *C. nobilior*. Em torno do átrio externo ao ostíolo foi observado um espessamento cutinizado acentuado que constitui uma crista estomática a qual contribui para a formação de uma câmara supra-estomática (Figura 10), semelhante às observadas por Zanega-Godoy et al. (2003) ao descreverem anatomia foliar de espécies de *Cattleya* do planalto central brasileiro, à qual uma delas é a *C. nobilior* e por Silva et al. (2004) ao descreverem *C. walkeriana*. De acordo com Silva et al. (2004) a respectiva câmara é característica comum nas orquídeas epífitas que contribui para a redução da transpiração foliar, visto que enfrentam temperaturas altas e baixa disponibilidade de água.

Nota-se que em ambas as faces do limbo foliar, em seção transversal, as paredes periclinais externas das células epidérmicas são espessas, apresentando quase sempre convexidade, especialmente no bordo. Também a cutícula (Figura 11 e 13) é espessa no bordo e em toda a extensão da face adaxial e abaxial homogeneamente, no entanto, de modo geral a parede das células presentes na face adaxial é sempre mais espessa. Adjacente à epiderme observou-se hipoderme, formada por uma camada de células com formatos diferentes do restante do parênquima do mesofilo. Esta camada foi observada, tanto na folha da planta que não foi submetida ao tratamento com palhada, sendo essa o controle (Figura 10), quanto às que foram submetidas aos tratamentos (Figura 13 e 14). Os estudos realizados por Lando et al. (2016) também foram com plantas aclimatizadas e, segundo esses autores os estratos hipodérmicos são estruturas adaptativas formadas em resposta a aclimatização. Tal resultado sugere que o uso proporcional de palhada não trouxe modificações em *C. nobilior*. Observou-se presença de feixes vasculares (Figura 11-12) na região do mesofilo, nas amostras foliares. Essa estrutura também foi observada por Zanega-Godoy et al. (2003) e Diniz et al. (2011) ao estudarem a mesma espécie do presente estudo e em outras espécies do mesmo gênero estudadas por Silva et al. (2004) e Lando et al. (2016). Segundo Silva et al. (2004) os feixes vasculares exercem a função de sustentação da lâmina foliar.

Em relação ao mesofilo (Figura 12), este apresentou-se homogêneo, compacto,

composto por parênquima clorofiliano (lacunoso), característica comum nessa família conforme descrito pelos autores Silva et al. (2004). Resultado semelhante para *Cattleya xanthina* (L.), em que as células no mesofilo na condição *in vitro* eram homogêneas com parênquima clorofiliano, mas heterogêneas sob as condições *ex vitro* (Lando et al. 2016). Uma das características comuns no mesofilo entre as espécies de orquídeas, é a presença de idioblastos com cristais do tipo ráfides, consideradas bem frequentes para *C. nobilior* como observaram Zanega-Godoy et al. (2003), às quais foram encontradas no presente estudo. Estruturas essas também observadas em *C. walkeriana* descrita por Silva et al. (2004) os quais relatam, que a presença desses cristais é considerada característica importante para análises cladísticas e, segundo Ferreira et al. (2015) alguns autores sugerem que esses cristais desempenham papel de defesa contra herbivoria por reduzir a digestibilidade das folhas ou, dependendo do tipo/forma, podendo levar o herbívoro à morte.

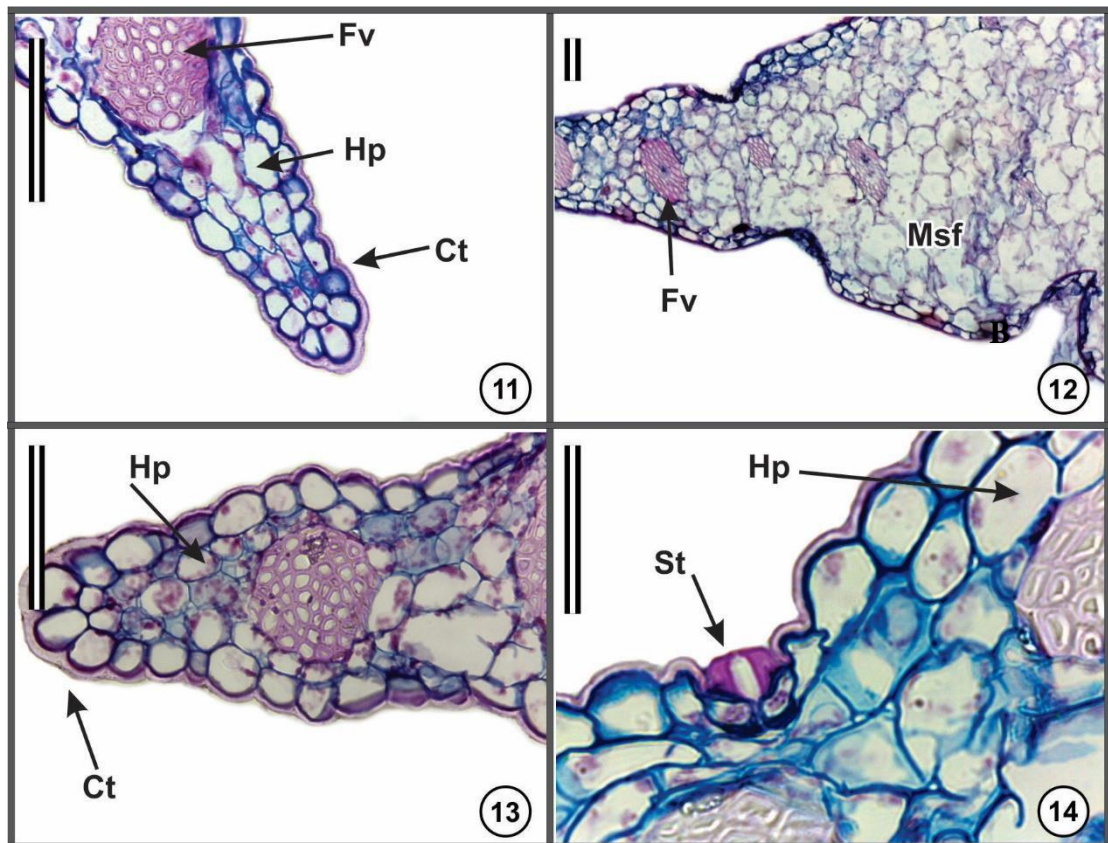
Características anatômicas foliares de espécies epífitas de Orchidaceae do gênero *Cattleya*, como as observadas no presente trabalho, praticamente não diferem entre si. Cutícula espessa (Figura 11 e 13) a qual funciona como barreira hidrofóbica protegendo a planta contra transpiração excessiva de água, também protegendo contra ação de patógenos, radiação solar (Javelle et al. 2010), posicionamento dos estômatos, células esclerificadas no mesofilo, hipoderme entre outros são consideradas adaptações estruturais e fisiológicas altamente eficientes na biologia de plantas adaptáveis a ambientes relacionados à economia de água (Zanenga-Godoy et al. 2003; Diniz et al. 2011).

Os estudos anatômicos realizados ao final da segunda fase de aclimatização mostraram que não houve diferença morfoanatômica entre os diferentes tratamentos utilizados. Isso pode ser observado nas figuras 11 e 12-14 com e sem tratamento, respectivamente. Sugere-se que sejam feitas análises morfoanatômicas em diferentes estágios da aclimatização para que sejam confirmados que o tratamento com palhada não interferiu no desenvolvimento dos tecidos estudados durante o processo de aclimatização. Sugere-se também análises em outros órgãos para verificar se o mesmo padrão de

desenvolvimento e mantido.

Estudos minuciosos em plantas oriundas de técnicas *in vitro* são importantes devido a criticidade de fatores que interferem na sobrevivência destas em campo, como é o caso da irradiação que pode influenciar na estrutura e composição foliar que possivelmente resulta em alta mortalidade (Silva et al. 2010; Lando et al. 2016).

Figura 11-14. Aspectos anatômicos de seções transversais da região basal de folhas de *Cattleya nobilior* (Orchidaceae) após 150 dias de aclimatização. 11 – corte transversal de folha do tratamento 6 (100% Bioplant); 12-13 - corte transversal de folha do tratamento 3 (60% palhada); 14 - corte transversal de folha do tratamento 5 (20% palhada). Barra = 100µm. Legenda: St = estômato; Hp = hipoderme; Fv = feixe vascular; Mf = mesofilo; Ct = cutícula.



Fonte: Silene Livia Aires de Oliveira, 2018

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A germinação das sementes e o desenvolvimento pós-germinativo de *C. nobilior* nos meios de cultura testados indicam que essa espécie encontrou as condições nutricionais mais adequadas no meio KC.

No que diz respeito ao processo de aclimatização, recomenda-se que o substrato inicial seja composto por 60% de palhada de soja e 40% de Biopiant uma vez que essas proporções favoreceram uma elevada taxa de sobrevivência bem como o melhor desenvolvimento do sistema radicial. Ao transferir as plantas para condições de viveiro, o substrato composto por 40% de palhada de soja e 60% de Biopiant favoreceu a maior taxa de sobrevivência, embora o desenvolvimento das plantas tenha sido superior no substrato composto por 20% de palhada e 80% de Biopiant. É interessante que sejam realizadas análises para avaliar a atividade fotossintética das plantas oriundas dos diferentes tratamentos. Tais dados poderão auxiliar no entendimento do comportamento dessas plantas durante essa importante fase da micropropagação uma vez que elucidarão aspectos envolvidos com o estresse ao longo da transição do cultivo *in vitro* para o ambiente de viveiro.

Tendo em vista que a palhada de soja se encontra disponível em grande quantidade e apresenta características físico-químicas que, quando associada ao Biopiant, não interfere negativamente no desenvolvimento de *C. nobilior*, conforme observado no presente estudo recomenda-se o uso da mesma como substrato alternativo em substituição ao xaxim e *Sphagnum*, pois ambos possuem proibição extrativista proibidos por órgãos ambientais.

A espécie estudada mostrou anatomia foliar característica do gênero *Cattleya*, apresentando estruturas anatômicas relacionadas a plantas epífitas adaptadas a ambientes com pouca disponibilidade de água. A presença de uma camada celular hipodérmica corrobora o fato de que variações estruturais nas folhas refletem adaptações das plantas para que obtenham estabilidade ao serem transferidas para o ambiente natural.

REFERÊNCIAS

- Alves, LR (2018) Análise da propagação e desenvolvimento inicial *in vitro*, e aclimatização de *Brassavola martiana* Lindl (Orchidaceae). Dissertação, Universidade Federal do Tocantins, Porto Nacional
- APG IV - The Angiosperm Phylogeny Group (2016) An up date of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV 2016. The Linnean Society of London, Botanical Journal of the Linnean Society, 181, 1–20
- Araújo AG, Pasqual M, Pereira AR, Rocha HS (2006) Crescimento *in vitro* de *Laelia tenebrosa* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de sais de Knudson C e carvão ativado. Plant Cell Culture and Micropropagation, Lavras v.2 n.2 61-67
- Assis AM, Faria RT, Unemoto LK, Colombo LA (2008) *Oncidium baueri* Lindley (Orchidaceae) cultivation in coconut-based substrates. Ciênc. agrotec. vol.32 no.3 Lavras May/June Print version ISSN 1413-7054 On-line version ISSN 1981-1829.
- Assis AM, Unemoto LK, Yamamoto LY, Lone, A B, Souza GRB, Faria RT, Roberto SR, Takahashi LSA (2011) Cultivo de orquídea em substratos à base de casca de café. Bragantia, Campinas, v. 70, n. 3, p.544-549
- Barros F, Vinhos F, Rodrigues VT, Barberena FFVA, Fraga CN, Pessoa EM, Forster W, Menini Neto L, Furtado SG, Nardy C, Azevedo CO & Guimarães LRS (2015) *Orchidaceae*. In Lista de Espécies da Flora do Brasil. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179>>
- Bertoncelli DJ, Alves GAC, Furlan FF, Freiria GH, Bazzo JHB, Faria RT (2018) Efeito do Glifosato no cultivo *in vitro* de *Cattleya nobilior* Rchb. F1 Rev. Ceres, Viçosa, v65, n2, p165-173, mar/abr doi: 10.1590/0034-737X201865020008
- Bianchetti LB (2007) *Cattleya nobilior* Rchb.f. Heringeriana. Brasília v1 n1 9-10
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (2008) Instrução normativa n. 6 de 23 de setembro de 2008. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/instrucao6.pdf>. > Acesso: 03 dez. 2018.
- Carneiro GT, Gonçalves, LM, Flores AS (2017) Anatomia foliar de duas espécies de *Cattleya* (Orchidaceae) endêmicas dos Escudos das Guianas. Biota Amazônia ISSN 2179-5746 Macapá, v7 n126-29. Disponível em <http://periodicos.unifap.br/index.php/biota>
- Colombo AL, Faria TR, Assis AM, Fonseca ICB (2005) Aclimação de um híbrido de *Cattleya* em substrato de origem vegetal sob dois sistemas de irrigação. Acta Scientiarum Agronomy, v. 27, n. 1, p. 145-150, jan./mar
- Cordeiro GM, Moraes CP, Massaro R, Cunha T (2011) Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya amethystoglossa* Lindley X *Cattleya dupreana* X *Laelia purpurata* Lindley em diferentes meios de cultura. Revista Científica Eletrônica de Agronomia, v18, p22-28, jul
- Cunha T, Cordeiro GM, Massaro R, Dezan LF, Moraes CP (2011) Desenvolvimento *in vitro*

de *Laeliocattleya schilleriana* Rolfe em meios de cultivo simplificados. Scientia Plena, v7, pp1-5, jul

Díaz LP, Namur JJ, Bollati SA, Arce OEA (2010) Acclimatization of *Phalaenopsis* and *Cattleya* obtained by micropropagation. Rev. colomb. Biotecnol v12 n2 27-40. doi: 10.15446/rev.colomb.biote

Diniz VSS, Fernandes, KS, Lima DCS (2011) Quantificação e caracterização de estômatos de três espécies do gênero *Cattleya* (Orchidaceae) nativas do cerrado. Enciclopédia Biosfera, v7 n13 1352-1359, 2011.

Dorneles LT, Trevelin V (2011) Aclimatização e reintrodução de *Cattleya intermedia* Graham ex Hook (Orchidaceae) obtidas por propagação *in vitro*. Iheringia v66 n2 167-174. ISSN: 2446-8231

Dutra D, Kane ME, Richardson L (2009) Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid Plant Cell Tiss Organ Cult 96:235–243 doi:10.1007/s11240-008-9480-z

Faria RT, Assis AM, Unemoto LK, Carvalho JFRP (2012) Produção de orquídeas em laboratório. Londrina: Mecenaz 124

Ferreira CS, Carmo WS, Graciano-Ribeiro D, Oliveira JMF, Melo RB, Franco AC (2015) Anatomia da lâmina foliar de onze espécies lenhosas dominantes nas savanas de Roraima. Acta Amazonica, v45 n4 337-346. doi <http://dx.doi.org/10.1590/1809-4392201500363>

Ferreira WM, Oliveira SP, Suzuki RM, Silva KLF, Junior JWS (2018) Germination, growth and morpho-anatomical development of *Catasetum macrocarpum* (Orchidaceae) *in vitro*. Rodriguésia v69 n4. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860201869442>

Ferreira WM, Suzuki RM, Pescador R, Figueiredo-Ribeiro RCL, Kerbauy GB (2011) Propagation, growth, and carbohydrates of *Dendrobium* Second Love (Orchidaceae) *in vitro* as affected by sucrose, light, and dark. *In vitro* Cellular and Developmental Biology – Plant v47 420-427. doi: 10.1007/s11627-010-9311-x

Ferreira WM, Vasconcelos MC, Silva CCN, Oliveira HR, Suzuki RM (2017) Asymbiotic germination, multiplication and development of *Alatiglossum fuscopetalum* (Orchidaceae) as affected by culture medium, sucrose and growth regulators. Iheringia Série Botânica v72 n1 57-65. ISSN: 2446-8231

Figueiredo, LD, Kolb RM (2013) Novo substrato para o cultivo de orquídeas: estudo do seu potencial de uso em plantas de *Laelia pulcherrima*. R. bras. Biociência. Porto Alegre, v. 11, n. 4, p. 405-413, out./dez. 201. ISSN 1980-4849 (on-line) / 1679-2343 (print)

Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 02 Fev 2019

Javelle M, Vernoud V, Rogowsky PM, Ingram GC (2010) Epidermis: the formation and functions of a fundamental plant tissue. New Phytologist, v189 17-39

Johansen DA (1940) Plant microtechnique. New York: McGraw-Hill, 523p

- Jorge J, Juras MCR, Suzuki RM (2015) Germinação de sementes e desenvolvimento inicial de *Cattleya warneri* T. Moore (Orchidaceae) *in vitro*. R. bras. Bioci., Porto Alegre, v13 n3 134-141. ISSN 1980-4849
- Kämpf AN (2000) Seleção de materiais para uso como substrato. In: Kämpf AN, Fermino MH (Ed.) Substratos para plantas: a base da produção vegetal em recipientes. Porto Alegre: Gênese 139-145
- Krahl AH, Valsko JJ, Krahl DRP, Holanda ASS (2014) Primeiro registro de *Trichosalpinx egleri* (Pabst) Luer (Orchidaceae) para o estado do Amazonas (Brasil) e chave de identificação das espécies amazonenses do gênero *Trichosalpinx* Luer. Natureza on line 12 (3): 129-131.
- Knudson LA (1946) New nutrient Solution for germination of orchid seeds. American Orchid Society Bulletin v15 214-217.
- Kozai T, Fujiwara K, Hayashi M, Aitkem-Citristie J (1992) The *in vitro* environment and its control in micropopagation. In Transplant production systems. (K. Kurata & T. Kozai. ed.). Kluwer Academic, Dordrecht, 247-282
- Kraus JE, Kerbaux GB, Monteiro WR (2006) Desenvolvimento de protocormos de *Catasetum pileatum* Rchb. F. *in vitro*: aspectos estruturais e conceituais. Hoehnea, 33:177-184.
- Lando AP, Wolfart MR, Fermino PCP, Santos JM (2016) Structural effects on *Cattleya xanthina* leaves cultivated *in vitro* and acclimatized *ex vitro* Biologia Plantarum 60 (2): 219-225. doi: 10.1007/s10535-016-0589-3
- Lesar H, Hlebec B, Čeranič N, Kastelec D, Luthar Z (2012) Acclimatization of terrestrial orchid *Bletilla striata* Rchb.f. (Orchidaceae) propagated under *in vitro* conditions. Acta agricultura e Slovenica, 99 - 1 69 – 75. Agris category code: F02, F62. COBISS Code 1.01
- Lone AB, Barbosa CM, Takahashi LSA, Faria RT (2008) Aclimatização de *Cattleya* (Orchidaceae), em substratos alternativos ao xaxim e ao *Sphagnum*. Acta Sci. Agron. Maringá, v30 n4 465-469. doi: <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v30i4.5299>
- Luque R, Sousa HC, Kraus JE (1996) Métodos de coloração de Roeser (1972) - modificado - e kropp visando a substituição do azul de astra. Acta bot. bras. 10(2)
- Macedo MC, Rosa DBCJ, Soares JS, Tatara MB, Hofmann NTK, Rosa YBCJ (2014) Armazenamento de sementes e aclimatização de *Brassavola tuberculata* Hook. Semina: Ciências Agrárias, v35 n6 2883-2894. doi: 10.5433/1679-0359.2014v35n6p2883
- Mengarda LHG, Cola GPA, Oliveira FSC, Freitas AR (2017) Multiplication, rooting *in vitro*, and acclimatization of *Brassavola tuberculata* Hook. (orchidaceae), an orchid endemic to the Brazilian Atlantic rainforest. Bioscience Journal, v33 n3 730-738
- Meurer FM, Barbosa C, Zonetti PC, Munhoz REF (2008) Avaliação do uso de bagaço de cana-de-açúcar como substrato no cultivo de mudas de orquídeas. Revista de Saúde e Biologia, v3, p45-50
- Moraes CP, Diogo JÁ, Pedro NP, Canabrava RI, Martini GA, Marteline MA (2009) Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) utilizando

fertilizantes comerciais. Revista Brasileira de Biociências, v7, p67-69, ago

- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures *Physiologia Plantarum*, v. 15, p. 473-497 doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Oliveira JRG (2018) Análise da multiplicação e desenvolvimento inicial *in vitro*, e aclimatização de *Encyclia flava* (LINDL.) Porto & Brade (Orchidaceae) Dissertação, Universidade Federal do Tocantins, Porto Nacional
- Ortega-Loeza MM, Garciglia RS, Alonso CG & Díaz IA (2011) Acclimatization of the endangered Mexican epiphytic orchid, *Laelia speciosa* (H.B.K.) Schltr. *European Journal of Environmental Science* 1: 48-54
- Paul S, Kumaria S, Tandon P (2012) An effective nutrient medium for asymbiotic seed germination and large-scale *in vitro* regeneration of *Dendrobium hookerianum*, a threatened orchid of northeast India. *AoB Plants*, v.2 1-12. doi:10.1093/aobpla/plr032
- Ponert J, Figura T, Vovolsobe S, Lipavska H, Vohnik M, Jersakova J (2013) Asymbiotic germination of mature seeds and protocorm development of *Pseudor chisalbida* (Orchidaceae) are inhibited by nitrates even at extremely low concentrations. *Botany* v.91 n.10 662-670. doi: <https://doi.org/10.1139/cjb-2013-0082>
- Riverón-Giró FB, Damon A, García-González A, Solís-Montero L, Aguilar-Romero O, Ramírez-Marcial N, Nieto G (2017) Anatomy of the invasive orchid *Oeceoclades maculata*: ecological implications. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v184 94-112. doi: <https://doi.org/10.1093/botlinnean/box014>
- Rodriguez DP, Barros F, Damasceno Junior GA, Bortolotto IM (2009) Levantamento da família Orchidaceae no Morro Santa Cruz, municípios de Corumbá e Ladário, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Hoehnea*, São Paulo, v36, n4, 613-636. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S2236-89062009000400004>
- Santos MN, Teixeira MLF (2010) Sementes de amendoeira (*Terminalia catappa* L.) (Combretaceae) como substrato para o cultivo de orquídeas epífitas. *Acta Scientiarum, Agronomy* 32: 339-343. doi: 10.4025/actasciagron.v32i2.1829
- Saoncella AL, Marteline MA, Pedroso-de-Moraes C (2017) Anatomia dos órgãos vegetativos de *Cattleya violacea* (Kunth) Rolfe (Orchidaceae). *Iheringia, Série Botânica*, v72 n1 114-126. doi: 10.21826/2446-8231201772110
- Sasamori MH, Júnior DE, Droste A (2014) Sobrevivência e desenvolvimento de plântulas de *Cattleya intermedia* graham (orchidaceae) micropropagadas e aclimatadas em substratos com fibra de coco. São Leopoldo: Instituto Anchietano de Pesquisas, Pesquisas, Botânica n.65 293-303
- Schneiders D, Pescador R, Booz MR, Suzuki RM (2012) Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp. Orchidaceae). *Rev. Ceres*, v59 n2 185-191. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-737X2012000200006>

- Silva CS, Araújo LG, Sousa KCI, Silva DM, Sibov ST, Faria PR (2017) Germinação e desenvolvimento *in vitro* de orquídea epífita do Cerrado. Ornamental Horticultura, v.23 n.1 96-100. doi: <http://dx.doi.org/10.14295/oh.v23i1.923>
- Silva AB, Lima PP, Oliveira LES, Moreira AL (2014) *In vitro* growth and leaf anatomy of *Cattleya walkeriana* (Gardner, 1839) grown in natural ventilation system. Revista Ceres, v61 883-890. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/0034-737X201461060001>
- Silva CI, Milaneze-Gutierrez MA (2004) Caracterização morfo-anatômica dos órgãos vegetativos de *Cattleya walkeriana* Gardner (Orchidaceae). Acta Scientiarum. Biological Sciences, v26 n1 91-100. doi: 10.4025/actascibiolsci.v26i1.16
- Silva EF, Villa F, Pasqual M (2009) Meio de cultura knudson modificado utilizado no cultivo *in vitro* de um híbrido de orquídea. Scientia Agraria, v10 n4 267-274. ISSN 1519-1125
- Silva AS, Oliveira JG, Cunha M, Vitória AP (2010) Photosynthetic performance and anatomical adaptations in *Byrsonima sericea* DC. under contrasting light conditions in a remnant of the Atlantic forest. - Braz. J. Plant. Physiol. 22: 245-254. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-04202010000400004>
- Souza M (2003) Muito além do xaxim. Natureza, São Paulo v.1 n.2 32-37
- Spoerl E (1948) Amino acids as sources of nitrogen for orchid embryos. Am. J. Bot., Columbus, v35, p88-95
- Stancato GC, Bemelmans PF, Vegro CLR (2001) Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. Revista Brasileira de Horticultura Ornamental, Campinas, v.7 n.1 25-33. doi: <https://doi.org/10.14295/rbho.v7i1.74>
- Stancato GC, Abreu MF, Furlani ÂMC (2008) Crescimento de orquídeas epífitas *in vitro*: adição de polpa de frutos. Bragantia, Campinas, v.67, n.1, p.51-57
- Stewart J (1989) Orchid propagation by tissue culture techniques – past, present and future. In: PRITCHARD, H. W. Modern methods in orchid conservation: the role of physiology, ecology and management. Cambridge: Cambridge University Press p. 147-183
- Stewart SL, Kane ME (2006) Asymbiotic seed germination *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. Plant Cell Tissue Organ Culture, v.86 147-158. doi: 10.1007/s11240-006-9098-y
- Suzuki RM, Almeida V, Pescador R, Ferreira WM (2010) Germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindley (Orchidaceae). Hoehnea 37(4): 731-742. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S2236-89062010000400004>
- Suzuki RM, Moreira VC, Nakabashi M, Ferreira WM (2009) Estudo da germinação e crescimento *in vitro* de *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Chiron & V.P. Castro (Orchidaceae), uma espécie da flora brasileira ameaçada de extinção. Hoehnea, v36 n4 657-666. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S2236-89062009000400006>
- Vacin EF, Went FW (1949) Some pH Changes in nutrient solutions. Botanical Gazette, v.110 n.4 605-613 doi:10.1086/335561

- Wotavová-Novotná K, Vejsadová H, Kindlmann P (2007) Effects of sugars and growth regulators on *in vitro* growth of *Dactylorhiza* species. *Biologia Plantarum* v.51 198-200. doi: 10.1007/s10535-007-0040-x
- Yamamoto LY, Sorace M, Faria RT (2009) Takahashi, L.S.; Schnitzer, J.A. Substratos alternativos ao xaxim no cultivo do híbrido primário *Miltonia regnellii* Rchb. f. x *Oncidium concolor* Hook. (Orchidaceae). *Semina: Ciências Agrárias*, v30, p1035-1042
- Zanega-Godoy R, Costa CG (2003) Anatomia foliar de quatro espécies do gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) do planalto central brasileiro. *Acta Botânica Brasílica*, v17 101-118. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062003000100008>